

电容法研究卵磷脂/氨基酸/H₂O 胶束和囊泡体系

刘天晴* 汤 瑶 禹克伟

(扬州大学化学化工学院, 江苏 扬州 225002)

摘要: 运用电容法研究卵磷脂/氨基酸/H₂O 胶束和囊泡体系结构与性质. 卵磷脂的临界胶束浓度和囊泡生成浓度可由体系电容-卵磷脂浓度关系曲线求得. 随着卵磷脂浓度增加, 体系电容增加, 卵磷脂由胶束形成囊泡. 随着氨基酸浓度增加, 胶束、囊泡半径增大, 体系电容减小. 氨基酸能促进卵磷脂形成胶束和囊泡, 使得卵磷脂临界胶束浓度和囊泡生成浓度减小, 其影响的强弱顺序为组氨酸>色氨酸>>甘氨酸.

关键词: 胶束; 电容; 囊泡; 卵磷脂; 氨基酸

中图分类号: O648

Study on Lecithin/Amino Acid/H₂O Micelle and Liposome Systems by Capacitance Method

LIU Tian-Qing* TANG Yao YU Ke-Wei

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225002, Jiangsu Province, P. R. China)

Abstract: The structures and properties of lecithin/amino acid/H₂O micelle and liposome systems were studied using electrical capacitance. The critical micellar concentration and the liposome formation concentration of lecithin can be obtained from the relation of system capacitance with lecithin's concentration. With an increase in lecithin concentration, the capacitance increases and lecithin aggregates from the micelles to liposomes. With the increase of amino acids, the radii of the micelles and liposomes increase but the capacitance decreases. Amino acids can promote micelle and liposome formation as well as decrease the critical micellar concentration and the formation concentration. The sequence of amino acid influence on the capacitance is as follows: histidine>tryptophan>>glycine.

Key Words: Micelle; Capacitance; Liposome; Lecithin; Amino acid

磷脂是一类具有重要生理功能的类脂化合物^[1], 是细胞膜的重要组成体, 在生命、医药、日用化工等领域有着广泛的用途. 卵磷脂分子具有一个亲油部分(包括两个依附于甘油主架结构上的脂肪酸), 以及一个由胆碱磷酸酯、胆胺或肌醇等组成的亲水部分^[2]. 囊泡是一种球形或椭圆形的单室或多室封闭双层结构的有序组织聚集体. 一般由两亲分子进行定向单层尾对尾的结合构成封闭性双层外壳, 其壳内包

含着微水相^[3-7]. 1967年英国学者 Bangham 等^[8]发现磷脂分散在水中可以形成多层囊泡, 并且证明每层囊泡均为双分子层脂质膜且被水相隔开. 由天然磷脂分子定向排列形成的双层膜包裹的闭合结构的囊泡, 也称为脂质体(liposome)^[9], 具有类似生物膜结构. 磷脂囊泡在日用化工、医药、生命科学、材料和生物科学等方面已都有广泛的应用.

氨基酸在生命体中具有重要作用. 甘氨酸(Gly)

Received: July 1, 2009; Revised: October 12, 2009; Published on Web: December 16, 2009.

*Corresponding author. Email: tqliu@yzu.edu.cn; Tel: +86-514-87975590-9517; Fax: +86-514-87975244.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (20573091) and Foundation of the Educational Committee of Jiangsu Provincial Universities Excellence Science and Technology Invention Team in Yangzhou University, China.

国家自然科学基金(20573091)和江苏省高校创新团队(扬州大学)基金资助项目

具有重要的缓冲、制酸和解毒功能. 色氨酸(Trp)在人和动物生命活动和新陈代谢中起着重要作用, 是合成激素和生理活性物质的前体物. 组氨酸(His)含有高反应活性的咪唑环, 在生物体系中金属离子的传输和神经递质的传送等方面起着重要的作用^[10-11]. 在生命体系中, 氨基酸与磷脂囊泡共存, 体系的电性质影响它们之间的相互作用与功能. 体系的电容性质与氨基酸和囊泡的结构、性质、转换、传输等关系的研究尚未见报道.

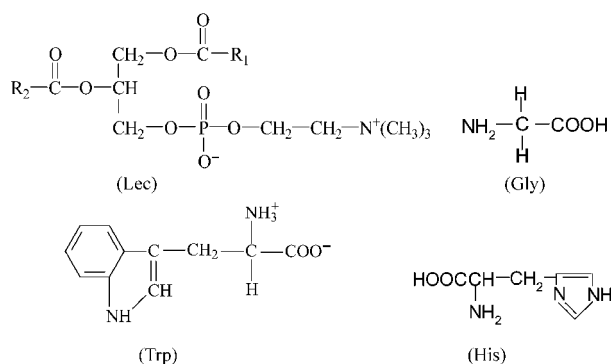
本文应用电容法研究卵磷脂/氨基酸/H₂O 胶束和囊泡体系的电容性质, 探讨氨基酸与磷脂囊泡对体系电容性质的影响, 了解磷脂囊泡的生成与转换过程, 为从电学角度研究磷脂囊泡的性质和氨基酸对磷脂囊泡结构的影响提供可能性, 为氨基酸对磷脂囊泡的结构、性质、转换、传输等作用的研究提供理论信息.

1 实验部分

1.1 试剂

蛋黄卵磷脂(Lec, BR, 北京双旋微生物培养基制品厂), 甘氨酸(Gly)、色氨酸(Trp)、组氨酸(His)(国药集团化学试剂有限公司)和苾(Sigma公司, >99%), 水为二次蒸馏水.

蛋黄卵磷脂、甘氨酸、色氨酸和组氨酸分子结构如下:



其中 R₁ 和 R₂ 分别为 C₁₈ 和 C₂₀ 饱和脂肪酸.

1.2 溶液的配制

将 1.2006 g 乙醇加入到含有 3.5015g 卵磷脂的磨口试管中, 盖上磨口塞, 振荡, 使卵磷脂完全溶解. 用微量注射器吸取一定量的乙醇-卵磷脂溶液, 加入到含有二次蒸馏水的容量瓶中, 混合、超声后, 配制所需浓度的卵磷脂/H₂O 溶液或卵磷脂/氨基酸/H₂O 溶液. 本文中所有溶液的乙醇含量均控制为 1.0×10⁻⁵

mol·L⁻¹.

1.3 体系电容测定

体系电容由 Model 283 Potentiostat/Galvanostat 和 Model 5210 Lock-in Amplifier (EG&G Instruments, Princeton Applied Research Co. USA)测定. Pt-Pt 电极面积为 1.0 cm×1.0 cm, 两极间距离为 1.0 cm. 测量频率范围为 100 kHz–10 mHz, 平衡时间为 10 s. 由测得的 Warburg 复平面阻抗图可得体系电容. 测量系统已经标准模拟电路校正.

1.4 囊泡负染-透射电镜(NS-TEM)^[12-13]

将含有囊泡的样品滴在 200 目具有 Formvar 膜的载网上. 样品在 Formvar 膜上吸附 15 min 后, 滴加染液磷钨酸. 1–2 min 后, 用滤纸吸去多余的染液, 烘干. 在 TECNAIR 透射电镜(Philip Apparatus Co., USA)下可直接观察囊泡的大小与形貌.

1.5 冷冻蚀刻-透射电镜(FF-TEM)测量^[14-18]

胶束和囊泡的大小与形貌可由冷冻蚀刻-透射电镜法获得(BAF 400D 冷冻蚀刻仪, Balzers Co., 德国). 将待测样品滴入铜制样品池中, 置于液氮内快速冷冻, 通过控温控压将样品断裂、蚀刻、复型、复型膜剥离与捞取, 最终制成样品. 冷冻蚀刻后的样品在透射电子显微镜(TECNAI 12 Philip Apparatus Co., USA)下观测并拍照.

1.6 动态光散射测量

由动态/静态光散射可测量胶束和囊泡的大小. 动态/静态光散射测量(DLS/SLS)由 He-Ne 激光(Model 1145p-3083, 德国. 输出功率为 22 mW, 波长 632.8 nm)散射仪(ALV-5022)和数字转换器(时间范围为 25 ns–40 ms, ALV/DLS/SLS-5022F, ALV Co., 德国)组成. 测量、捕获时间 10 min, 连续测量五次, 取五次平均结果. 数据累积方法和计算均在 DLS/SLS Model 1145p-3080 仪器分析处理软件上进行.

1.7 微极性测量

以苾为荧光探针, 在激发波长为 338 nm 的条件下, 测定苾在不同体系中的稳态荧光光谱(RF-5301PC 型荧光光谱仪, Shimadzu 公司, 日本). 用苾的第一发射峰(373 nm 附近)与第三发射峰(384 nm 附近)荧光强度之比(I₁/I₃)表示苾所处微环境的极性^[19]. 苾浓度为 1.4×10⁻⁶ mol·L⁻¹.

以上实验均在(25.0±0.1) °C 条件下进行. 为了使各相达到平衡, 稳定时间至少为 12 h.

2 结果与讨论

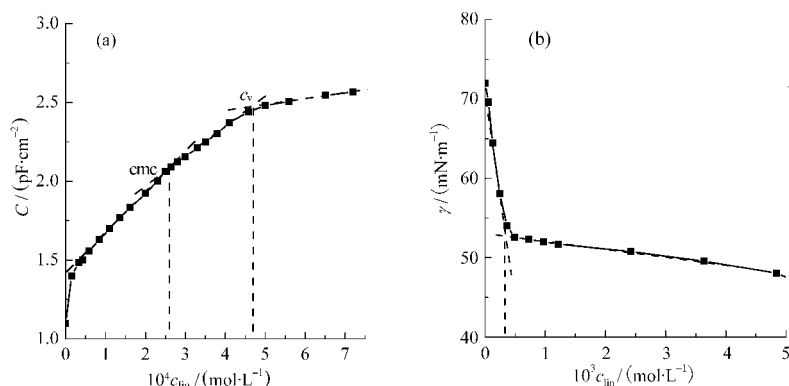


图 1 卵磷脂水溶液的电容(a)和表面张力(b)与卵磷脂浓度(c_{in})的关系

Fig.1 Relation of lecithin/H₂O systems' capacitance (a) and surface tension (b) with lecithin concentration (c_{in})

cmc: critical micellar concentration; c_l : liposome formation concentration

2.1 卵磷脂水溶液体系的电容性质

在卵磷脂/H₂O 体系中, 随着卵磷脂浓度的增加, 体系电容增加, 在体系电容-卵磷脂浓度曲线中出现两个转折点(图 1(a)). 体系电容除与溶质和溶剂等性质有关外, 还与体系中分子的聚集状态有关^[20]. 在电容池的极板面积和极板间距离一定时, 极板间的物质量越多, 待测物分子与电场的相互作用越大, 电容也越大. 一般来说, 溶液中极性分子浓度越稀, 电容越小. 物质与电场间相互作用越大, 越易发生定向排列, 导致电容增加.

随着体系中卵磷脂浓度增加, 具有极性的卵磷脂数目增多, 体系电容增加. 当体系中卵磷脂浓度增加到卵磷脂形成胶束时, 由于球形胶束聚集体的形成, 卵磷脂在电场作用下迎着电场方向定向排列的数目减小, 使得体系电容缓慢增加. 当卵磷脂浓度继续增加到囊泡生成时, 由于具有空心结构的囊泡电容比相同大小的胶束的电容小, 虽然随着卵磷脂浓度增加体系中囊泡数目增多, 但体系电容随着卵磷脂浓度增加而增加的幅度较胶束体系中小. 因此, 图

1(a)曲线中两个转折点分别对应为卵磷脂的临界胶束浓度(cmc, $2.55 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和囊泡生成浓度(c_l , $4.69 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 电容法所测得的卵磷脂的临界胶束浓度与表面张力法所测得的卵磷脂的临界胶束浓度(图 1(b))基本一致.

实验研究发现, 在卵磷脂/H₂O 体系中, 当体系中卵磷脂浓度小于 $2.50 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 由动态光散射法测得体系的流体力学半径接近为 0 nm, 体系的冷冻蚀刻-电镜照片中也未发现任何聚集体存在, 可以推断此时卵磷脂是以单体的形式存在. 当体系中卵磷脂浓度大于 $2.66 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的负染-电镜照片、冷冻蚀刻-电镜照片(图 2(a, b))和动态光散射(图3)的测量结果均表明, 体系中有半径约为 5-8 nm 的液滴存在, 并且在负染-电镜照片中未发现双分子层的圆环带即囊泡的存在, 此时表面张力也基本保持一定值(图 1(b)). 因此, 可推断在此卵磷脂浓度区间内, 聚集(液滴)为胶束. 只有当体系中卵磷脂浓度大于 $4.84 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体系的负染-电镜照片和冷冻蚀刻-电镜照片中才发现囊泡的

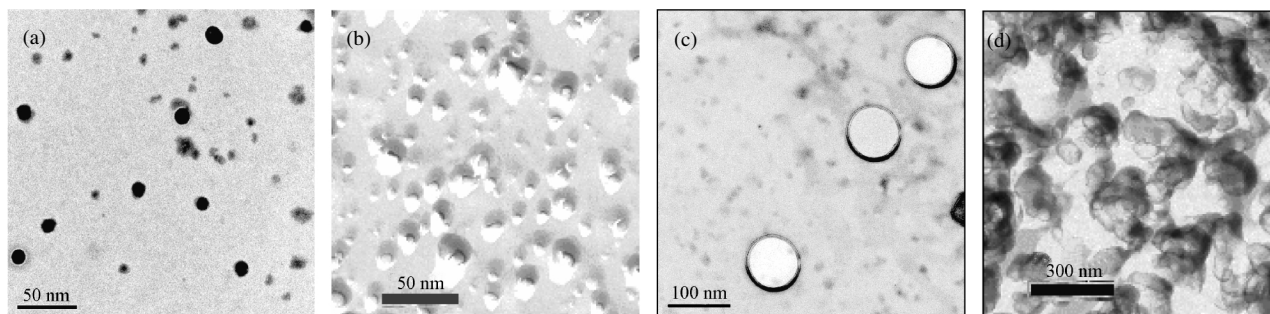


图 2 卵磷脂/水体系中胶束和囊泡的负染-透射电镜照片(a, c)和冷冻蚀刻-透射电子显微镜(b, d)

Fig.2 Negative staining-transmission electron microscopy (NS-TEM) images (a, c) and freeze etchin(FF)-TEM images (b, d) of the micelle and liposome in lecithin/H₂O system

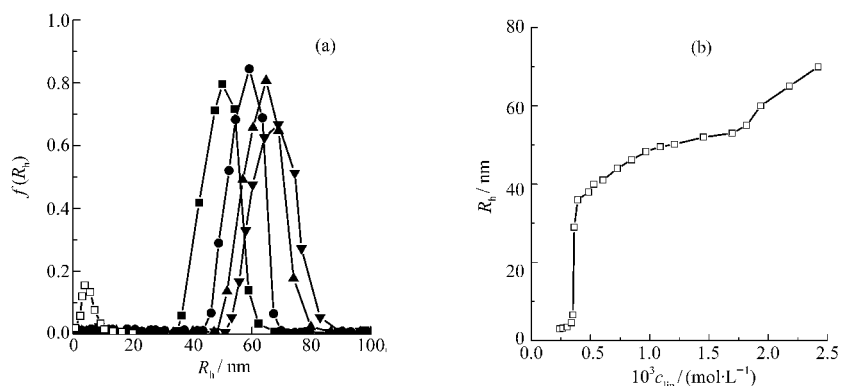


图3 卵磷脂浓度对胶束和囊泡的流体力学半径(R_h)的影响

Fig.3 Effect of lecithin concentration on hydrodynamic radius (R_h) of micelle and liposome

(a) $f(R_h)$: hydrodynamic radius distribution, $c_{lm}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: \blacksquare 1.0×10^{-3} , \bullet 2.0×10^{-3} , \blacktriangle 2.25×10^{-3} , \blacktriangledown 2.5×10^{-3} , \square 2.32×10^{-4} ; (b) The micelle can exist in $2.55\times 10^{-4} - 4.69\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ lecithin. The liposome is formed when lecithin concentration is more than $5.0\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

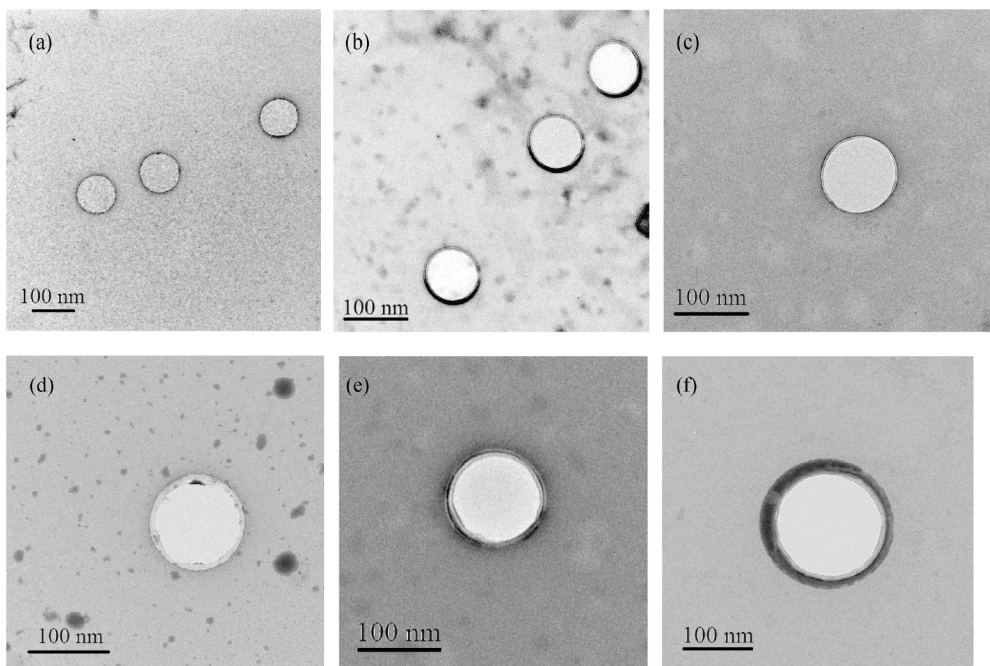


图4 卵磷脂/水体系中囊泡负染-透射电镜照片

Fig.4 NS-TEM images of liposome in lecithin/ H_2O system

$c_{lm}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: (a) 4.84×10^{-4} , (b) 6.50×10^{-4} , (c) 8.12×10^{-4} , (d) 9.55×10^{-4} , (e) 1.03×10^{-3} , (f) 1.22×10^{-3}

存在(图 2(c, d)); 并且随着卵磷脂浓度增加, 囊泡体积增大, 囊泡的多层膜出现(图4)。动态光散射法测量结果(图 3)表明, 当卵磷脂浓度增加到囊泡形成时, 由于囊泡半径远大于胶束半径, 使得图 3(b)中流体力学半径快速增加。当体系中卵磷脂浓度大于 $2.0\times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 由于囊泡相互聚集变大, 导致流体力学半径又快速增加。

2.2 氨基酸对卵磷脂体系电容的影响

氨基酸为两性物质, 甘氨酸、色氨酸和组氨酸的等电点分别为 5.97、5.90 和 7.59^[21]。在中性溶液中,

甘氨酸和色氨酸带负电性, 而组氨酸带正电性。在卵磷脂/ H_2O 体系中, 加入氨基酸, 出现一有趣的现象, 体系电容不但没有增加, 反而减小(图 5)。可能的原因是, 随着氨基酸浓度增加, 虽然体系中极性分子的数目增加, 引起体系电容增大。但另一方面, 氨基酸与卵磷脂间产生较强的氢键作用、亲水作用与疏水作用, 因此氨基酸的加入, 导致卵磷脂与氨基酸作用增强, 甚至能形成卵磷脂-氨基酸聚集体, 使体系电容减小。在卵磷脂的胶束、囊泡体系中, 氨基酸定位于胶束、囊泡的膜相栅栏层中, 以减小卵磷脂极性头

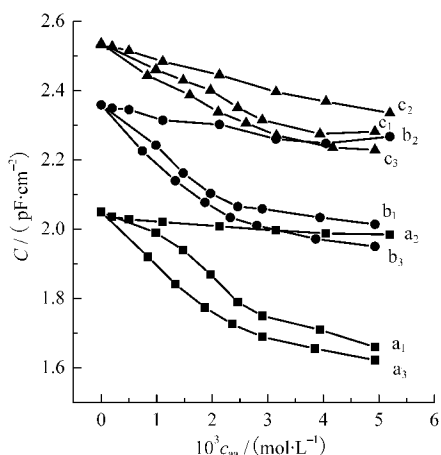


图5 氨基酸浓度(c_{aa})对卵磷脂/水体系电容的影响
Fig.5 Effect of amino acid concentration (c_{aa}) on lecithin/H₂O systems' capacitance

$c_{lin}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: a₁, a₂, a₃ 1.85×10^{-4} , b₁, b₂, b₃ 3.80×10^{-4} , c₁, c₂, c₃ 6.52×10^{-4} ; a₁, b₁, c₁ Trp, a₂, b₂, c₂: Gly, a₃, b₃, c₃: His

间的相互作用, 更有利于胶束、囊泡的聚集与稳定, 结果导致胶束和囊泡刚性增强, 在电场下变形度减小, 极化能力减弱, 体系电容减小. 这一现象可能为生命体中氨基酸对脂质体的结构、性质的影响起到了重要作用.

从图5还可看出, 在卵磷脂/H₂O/氨基酸体系中, 色氨酸和组氨酸对体系电容的影响较甘氨酸对体系电容的影响大. 由于甘氨酸亲水能力较强, 分子又较小, 因此, 它定位、溶解在胶束、囊泡相中的含量相对较小, 可能相当于一负电性离子对胶束、囊泡的作用与影响. 所以, 随着甘氨酸浓度的增加, 体系电容线

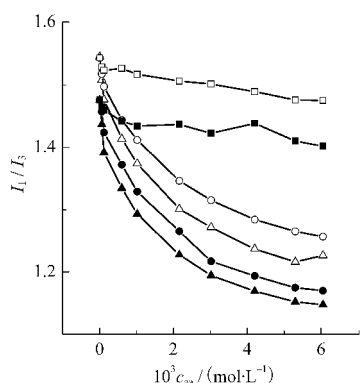


图6 氨基酸浓度对卵磷脂/水胶束和囊泡体系中芘探针微极性(I_1/I_3)的影响

Fig.6 Effect of amino acid concentration on micropolarity (I_1/I_3) of pyrene as probe in lecithin/H₂O micelle and liposome systems

$c_{lin}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$: ■●▲ 3.80×10^{-4} , □○△ 6.52×10^{-4} ; ■□ Gly, ●○ Trp, ▲△ His

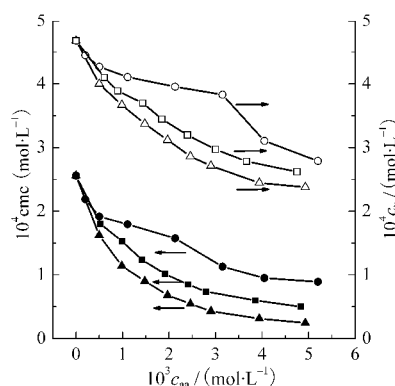


图7 氨基酸浓度对卵磷脂的 cmc 和 c_v 的影响
Fig.7 Effect of amino acid concentration on cmc and c_v of lecithin
■□ Trp, ●○ Gly, ▲△ His

性减小. 色氨酸和组氨酸虽然电性不同, 但他们均含有疏水基, 疏水性较强, 更易定位于胶束、囊泡的膜相栅栏层中, 以减小卵磷脂极性头间的相互作用, 从而导致胶束、囊泡的刚性增强, 在电场作用下其变形、极化度减小, 体系电容快速减小. 氨基酸对卵磷脂胶束体系和卵磷脂囊泡体系中芘探针微极性的影响(图6)结果表明, 随着氨基酸浓度增加, 芘探针微极性逐渐减小, 微极性减小的幅度的顺序为: 组氨酸>色氨酸>>甘氨酸. 这表明带正电性的组氨酸较带负电性色氨酸更容易进入到胶束、囊泡的膜相栅栏层, 胶束、囊泡的稳定性和刚性得到进一步增强.

2.3 氨基酸对卵磷脂胶束和囊泡生成性质的影响

在卵磷脂/H₂O/氨基酸体系中, 体系电容随卵磷脂浓度的增加而增加, 但随氨基酸浓度的增加而减小. 由体系电容与卵磷脂浓度和氨基酸浓度的关系, 可获得氨基酸浓度与卵磷脂的临界胶束浓度(cmc)和囊泡生成浓度(c_v)的关系曲线(图7). 一方面, 由于氨基酸与卵磷脂间能产生较强的氢键作用、亲水作用与疏水作用, 氨基酸定位于胶束、囊泡的膜相栅栏层中以减小卵磷脂极性头间的相互作用, 有利于胶束、囊泡的聚集与稳定. 另一方面, 带电性氨基酸的加入, 使体系离子强度增加, 卵磷脂极性基团的溶剂化程度减小, 使得卵磷脂更易聚集形成胶束和囊泡. 因此, 氨基酸能够促进卵磷脂形成胶束和囊泡, 导致卵磷脂的临界胶束浓度和囊泡生成浓度均减小, 其影响的强弱顺序为组氨酸>色氨酸>>甘氨酸, 这与氨基酸对卵磷脂体系电容影响的强弱顺序(图5)基本一致.

3 结 论

成功地运用电容法研究卵磷脂/氨基酸/H₂O 胶束、囊泡体系结构与性质, 从电容-浓度曲线上可获得卵磷脂的临界胶束浓度和囊泡生成浓度. 随着卵磷脂浓度增加, 卵磷脂先形成胶束, 再生成囊泡. 体系电容随卵磷脂浓度的增加而增大, 但随着氨基酸浓度的增加而减小. 氨基酸能够促进卵磷脂形成胶束和囊泡, 影响胶束和囊泡的电容性质与稳定性. 氨基酸和磷脂的结构与含量可能影响生命体系中电容及其它电学性质, 甚至能影响氨基酸与磷脂囊泡的结构、性质、含量、转换和传输等功能调节.

References

- 1 Han, Y.; Zhou, Y.; Zhao, Y. F. *Amino Acids & Biotic Resources*, **2001**, **23**(2): 28 [韩 轶, 周 扬, 赵永芳. 氨基酸和生物资源, **2001**, **23**(2): 28]
- 2 Sun, G. H.; Li, K. X.; Fan, H.; Gu, J. Y.; Li, Q.; Liu, Y. *Acta Phys. - Chim. Sin.*, **2008**, **24**(1): 103 [孙国华, 李开喜, 范 慧, 谷建宇, 李 强, 刘 越. 物理化学学报, **2008**, **24**(1): 103]
- 3 Yao, J. X.; Zhao, Y.; Huang, J. B. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2006**, **22**(8): 913 [么敬霞, 赵 颖, 黄建滨. 物理化学学报, **2006**, **22**(8): 913]
- 4 Rui, Y.; Wang, S.; Low, P. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **44**: 11213
- 5 Choucair, A.; Soo, P. L.; Eisenberg, A. *Langmuir*, **2005**, **21**: 9308
- 6 Nagayasu, A.; Uchiyama, K.; Kiwada, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1999**, **40**: 75
- 7 Lee, J.; Lentz, R. B. *Biochemistry*, **1997**, **21**: 6251
- 8 Bangham, A. D.; Papahadjopoulos, D.; Bennett, P. B. *Life Sciences*, **1967**, **23**(6): 2527
- 9 Yu, W. L.; Zhao, G. X. *Chemistry*, **1996**, **6**(2): 21 [于网林, 赵国玺. 化学通报, **1996**, **6**(2): 21]
- 10 Creighton, T. E. *Encyclopedia of molecular biology*. Vol. 2. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999: 1147
- 11 Kusakari, Y.; Nishikawa, S.; Ishiguro, S. *Curr. Eye Res.*, **1997**, **16**: 600
- 12 Liu, T. Q.; Guo, R. *Langmuir*, **2005**, **21**: 11034
- 13 Hua, W.; Liu, T. Q. *Colloids and Surfaces A*, **2007**, **302**: 377
- 14 Lu, T.; Huang, J. B.; Liang, D. H. *Langmuir*, **2008**, **24**: 1740
- 15 Yin, H. Q.; Lin, Y. Y.; Huang, J. B.; Ye, J. P. *Langmuir*, **2007**, **23**: 4225
- 16 Wang, K.; Yin, H. Q.; Sha, W.; Huang, J. B.; Fu, H. L. *J. Phys. Chem. B*, **2007**, **111**(45): 12997
- 17 Hao, J. *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*, **2007**, **12**: 129
- 18 Hao, J. *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*, **2009**, **14**, 94
- 19 Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, **99**: 2039
- 20 Liu, T. Q.; Zhang, Q. Q.; Fan, G. K.; Guo, R. *Acta Chimica Sinica*, **2000**, **58**(7): 840 [刘天晴, 张启清, 范国康, 郭 荣. 化学学报, **2000**, **58**(7): 840]
- 21 David, R. L.; Frederikse, H. P. R. *CRC handbook of chemistry and physics*. New York: CRC Press, 1995: 7